

# AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA POR ABORDAGEM POLIFÁSICA DE CULTURAS DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO *TERREI* PRESERVADAS NA MICOTECA URM, SOB ÓLEO MINERAL

Joenny Maria da Silveira de Lima<sup>1</sup>; Cristina Maria de Souza-Motta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas com ênf. Ambiental- CCB – UFPE;  
joennym@gmail.com,<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Micologia – CCB –  
UFPE;souzamotta@yahoo.com.br

**Sumário:** O gênero *Aspergillus* se encontra entre os organismos mais abundantes e amplamente distribuídos na Terra e por isso adaptam-se à ampla variedade de ambientes aquáticos e terrestres, além de produzirem uma enorme diversidade de metabolitos. A Micoteca URM possui em seu acervo cerca de 80 culturas pertencentes à seção *Terrei*, porém, algumas culturas necessitam de uma revisão taxonômica devido à complexidade de se identificar algumas espécies. Assim, características morfológicas precisam ser combinadas com outros caracteres como o sequenciamento de DNA. E para se assegurar de resultados seguros e satisfatórios na classificação dos microrganismos, 28 culturas de *Aspergillus* pertencentes a seção *Terrei* mantidas na Coleção de Culturas Micoteca URM, sob o método de óleo mineral, foram reativadas, identificadas através da taxonomia clássica inoculando os isolados em 3 temperaturas distintas no CYA e MEA, e em seguida extraído DNA, amplificadas as regiões ITS 1 e ITS 2 e parcial do gene  $\beta$ -tubulina, o que nos dá a certeza de que os estudos com a biologia molecular e taxonômica devem ser feitos juntos para uma melhor compreensão e resultados precisos.

Palavras chave: aspergillus; molecular; taxonomia

## Introdução

Segundo Alexopoulos et al. (1996) o gênero *Aspergillus* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. Trata-se de um gênero de fungos anamórficos, cuja reprodução ocorre através da produção de conídios (esporos de origem assexuada). A principal característica deste gênero é a produção de conidióforos distintos. Espécies de *Aspergillus* seção *Terrei*, descrita por Gams et al. 1985, são economicamente importantes, destacando-se a espécie *A. terreus*, excelente produtora de ácidos e enzimas com aplicações biotecnológicas (Raper e Fennell, 1965). Atualmente, a seção *Terrei* abriga nove espécies, incluindo *Aspergillus terreus* e suas variedades, *A. niveus*, *A. carneus*, *A. niveus* var. *indicus*, *A. allahabadii*, *A. ambiguus* e *A. microcysticus* (Varga et al. 2005, Peterson, 2008, Samson, et al., 2011). A Coleção de Culturas - Micoteca URM, do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, que foi fundada em 1954, possui em seu acervo cerca de 80 culturas pertencentes à seção *Terrei*. No entanto, algumas culturas necessitam de uma revisão taxonômica devido à complexidade de se identificar algumas espécies. Desse modo, características morfológicas precisam ser combinadas com outros caracteres que incluem sequenciamento de DNA, dados fisiológicos, ecológicos e análise de extrólitos. Nos estudos moleculares, tem sido sugerido o sequenciamento da região ITS do rDNA para auxiliar na identificação de espécies estreitamente relacionadas, assim outros

loci variáveis, como  $\beta$ -tubulina, actina e calmodulina (Samson et al., 2007, 2011). Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram reativar, autenticar taxonomicamente através de taxonomia clássica e molecular 28 culturas de *Aspergillus* pertencentes a seção *Terrei* mantidas na Coleção de Culturas Micoteca URM, sob o método de óleo mineral.

## **Materiais e métodos**

### **1. Reativação e Autenticação das Culturas através de taxonomia clássica**

Todas as 28 culturas de *Aspergillus* seção *Terrei* foram reativadas e transferidas para tubos de ensaio contendo o meio Ágar Extrato de Malte. A autenticação taxonômica clássica foi procedida de acordo com Raper; Fennell, 1965 e Samson et al., 2007; 2010. Os esporos de cada cultura de *Aspergillus* foram suspensos e utilizados para inoculação em três pontos das placas de Petri com os meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA) e Ágar Extrato de Malte (MEA). A incubação ocorreu a 5°C, 25°C e 37°C. Para a identificação das espécies foram observadas características macroscópicas e microscópicas (com Raper; Fennell, 1965; Samson et al., 2007; 2010).

### **3. Identificação das espécies *Aspergillus* seção *Terrei* através de biologia molecular**

#### **3.1. Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA**

A extração do DNA genômico será realizada conforme Góes-Neto et al. (2005), que inclui uma lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) do micélio previamente triturados em tampão CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) 2%, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50  $\mu$ L de água ultrapura. As regiões ITS1 e ITS2 serão amplificadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') como descrito por White et al. (1990). A amplificação parcial do gene  $\beta$ -tubulina será realizada utilizando os iniciadores Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') (Glass & Donaldson, 1995). Todos os produtos de amplificação serão purificados com PureLink – PCR Purification Kit – Invitrogen e sequenciados no Departamento de Genética da UFPE.

## **Resultados**

Todas as 28 culturas preservadas sob óleo mineral estavam viáveis e preservaram suas características morfológicas e fisiológicas quando reativadas. Para autenticação taxonômica, as 28 culturas tiveram suas características macroscópicas e microscópicas avaliadas e sua identificação clássica confirmada. A extração do DNA genômico foi realizada, porém os isolados 1 e 9 não obtiveram bons resultados, logo após a extração foi feita a amplificação das regiões ITS do rDNA, parcial do gene  $\beta$ -tubulina e seus sequenciamentos. Pela região ITS do rDNA, cinco linhagens, antes identificadas como *Aspergillus carneus*, foram identificadas como *A. terreus*. Todas as 15 linhagens previamente identificadas como *A. terreus*, foram confirmadas pela análise da região ITS do rDNA. Das seis culturas previamente identificadas como *A. niveus*, apenas uma foi confirmada. As cinco restantes foram identificadas como *A. terreus*. Através do sequenciamento parcial do gene para  $\beta$ -tubulina, das 26 linhagens analisadas, apenas 21 apresentaram resultados satisfatórios, sendo todas identificadas como *Aspergillus terreus*. Para cinco linhagens, não foram obtidas seqüências viáveis.

## **Discussão**

Espécies pertencentes à Seção *Terrei* apresentam como características comuns a cabeça conidial colunar em tons de marrom. A espécie tipo da Seção é *Aspergillus terreus* Thom (Gams et al., 1985). Trata-se de um fungo comum em solos, mas facilmente

encontrado em outros ambientes (Samsom et al., 2011). Devido à aproximação morfológica apresentada pelas espécies do gênero *Aspergillus* que compõem a seção *Terrei*, tornou-se necessária a revisão de algumas destas culturas preservadas na Coleção de Culturas Micoteca URM. Tais culturas são frequentemente fornecidas tanto para pesquisas científicas, quanto para a utilização industrial. Diante da excelência e rigor da qualidade dos serviços prestados pela Micoteca URM, tais culturas precisam ter sua taxonomia autenticada através de uma abordagem polifásica na qual a biologia molecular tenha sido aplicada em complemento à taxonomia clássica, tornando o processo taxonômico mais refinado.

### Conclusão

- O método de preservação de culturas sob óleo mineral é eficiente para espécie de *Aspergillus* pertencentes à seção *Terrei*, mantendo suas características morfológicas e fisiológicas por até três décadas;
- Espécies de *Aspergillus* pertencentes à seção *Terrei* apresentam alta similaridade morfológica, sendo necessária para a sua taxonomia uma abordagem polifásica;
- A amplificação da região ITS do rDNA, bem como a amplificação parcial do gene para a  $\beta$ -tubulina, são importantes ferramentas para compor uma abordagem polifásica no processo de identificação.

### Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Cristina Motta pela orientação, a toda a equipe da micoteca URM e da biotecnologia que me apoiaram na execução do projeto, e ao Cnpq pela bolsa de auxílio financeiro.

### Referências

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Raper, K.B.; Thom, C. 1949. *A manual of the Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Varga, J., Kevei, F., Hamari, Z., Toth, B., Teren, J., Croft, J. H. & Kozakiewicz, Z. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*, pp. 397–411. Edited by R. A. Samson & J. I. Pitt. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 2000.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322, in Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. 1990
- Pitt, J.I. 1979. *The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces**. London, Academic Press.
- Lacaz, C. S; Porto, E.; Martins, J. E. C. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. rev. e ampl. São Paulo, Sarvier, pag. 695, 1991.



Acessos on-line: Micoteca URM. 2011. Disponível em <<http://www.ufpe.br/micoteca>>  
Acesso em 11 de setembro de 2015.